Istituto d'Igiene della R. Università di Palermo

BLASTOMICETE PATOGENO NELL'UOMO

CONTRIBUTO ALL'ETIOLOGIA DEI TUMORI MALIGNI

(con 4 tavole)

DEI

Dottori G. CORSELLI e B. FRISCO

In questi ultimi tempi colla scoperta di speciali microrganismi patogeni, appartenenti alla classe dei blastomiceti, che avrebbero la proprietà di produrre processi neoformativi caratterizzati dalla inclusione parassitaria di essi nelle cellule, la questione della etiologia dei tumori è entrata in una nuovissima fase.

Otto Busse, [1] in un lavoro abbastanza dettagliato, pubblicato l'11 agosto 1894, è stato il primo a richiamare l'attenzione sull'azione patogena dei blastomiceti. In un caso patologico di dubbia e oscura indole, che durante la vita fu diagnosticato come sarcoma magnicellulare della tibia, e che poi all'autopsia si presentò come una forma nuova di pioemia cronica con presenza di innumerevoli cellule giganti nei focolai suppurativi, egli rinvenne dei corpicciuoli chiari, splendenti, a doppio contorno, la cui grandezza oscillava da quella di un piccolo nucleo a quella di una cellula epatica. Questi corpicciuoli erano in parte liberi, in parte inclusi nelle cellule, per lo più nelle cellule giganti, e ricordavano le forme di microsporidî o i corpuscoli del Cornalia o le pretese inclusioni di coccidî, descritte da alcuni autori, nei tessuti neoplastici.

Gl'innesti fatti negli ordinari terreni nutritivi, sia col succo del tumore asportato durante la vita, sia col pus estratto dopo la morte, riuscirono positivi, dando luogo ad uno sviluppo facile ed abbondante di colonie, i cui elementi riproducevano presso a poco le stesse

[1] Otto Busse, *Ueber parassitäre Zelleinschlüsse und ihre Züchtung*. Centralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde, 1894, XVI, 175. — Idem, *Ueber Saccharomycosis hominis*. Virchow's Archiv, april 1895.

forme osservate nel materiale patologico, salvo che i corpicciuoli erano per lo più sprovvisti di doppio contorno. L'inoculazione così del materiale patologico che delle culture pure negli animali, determinava, oltre alla formazione di ascessi multipli cronici coi caratteri sopra notati, anche iperplasia delle glandole e sviluppo di un tessuto di granulazione con cellule giganti e con inclusioni cellulari. Queste lesioni, però, dopo un decorso di parecchi mesi, subivano un processo regressivo fino alla guarigione; solo nei topi bianchi si otteneva la morte.

In quanto alla natura del parassita, fondandosi sui caratteri morfologici e biologici il Busse, anche dietro il parere del prof. Loeffler, giudicò trattarsi di un blastomicete. Cosicchè da tali ricerche risultava dimostrato:

1° L'esistenza di un blastomicete patogeno;

2° L'attitudine di esso a spiegare la sua azione parassitaria nei tessuti sotto la forma di inclusioni cellulari;

3° La somiglianza morfologica di coteste inclusioni con le forme di microsporidî, coccidî, ecc., descritte da altri, nei tessuti di neoformazione.

Tale questione pertanto ha trovato in Italia uno sviluppo in parte maggiore, in parte diverso, in due recenti lavori, uno di Sanfelice (31 gennaio 1895), l'altro di Maffucci e Sirleo (1° marzo 1895); e poi in altri lavori successivi degli stessi autori.

Sanfelice, [1] nel corso di alcune sue ricerche sistematiche sui blastomiceti che si sviluppano sulle frutta, ebbe occasione di isolare dall'aria un blastomicete patogeno per gli animali, per certi riguardi simile, e per altri diverso da quello descritto dal Busse. Al pari di questo si sviluppa assai facilmente ed abbondantemente negli ordinari terreni nutritivi, e l' aspetto di esso è diverso nelle culture e nell'organismo: nelle prime il protoplasma che forma il contenuto delle cellule blastomicetiche è ialino, oppure composto di una parte ialina e di una parte alquanto rifrangente, ed è circondato da una membrana sottile, nei tessuti invece esso si riveste di una membrana rifrangente a doppio contorno e spesso anche di una seconda membrana ialina.

[1] Sanfelice, *Ueber eine für Thiere pathogene Sprosspilzart, und über die morphologische Uebereinstimmung, welche sie bei ihrem Vorkommen in den Geweben mit den vermeintlichen Krebscoccidien zeigt.* Centralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde, 1895, XVII, n. 4. — Idem, *Sull'azione patogena dei blastomiceti come contributo all'etiologia dei tumori maligni.* Il Policlinico, 1° maggio 1895. — Idem, *Sull'azione patogena dei blastomiceti.* Annali d'Igiene sperimentale, vol. V, fasc. 2°.

Le inoculazioni nelle cavie danno luogo alla produzione di noduli di aspetto neoplastico, sia localmente, sia in punti svariati dell'organismo, e nell'interno dei noduli si vedono culture pure abbondanti del parassita, il quale trovasi sia dentro, sia fuori le cellule.

Notevoli sono i metodi di colorazione studiati dal Sanfelice per mettere in evidenza tali forme parassitarie, sopra tutto se incluse nelle cellule; tanto che ne emergerebbe chiara, secondo l'autore, la identità morfologica tra queste inclusioni cellulari e quelle descritte nei neoplasmi dell'uomo come riferentisi a coccidî.

Esperienze sopra altri animali sono state per ora dall'autore soltanto accennate. Dai risultati pertanto delle inoculazioni fatte in una cagna, uccisa dopo circa quattro mesi che era stata inoculata in due mammelle, e di un gallo, al quale fu asportato il bargiglio dopo altrettanto tempo che vi si era inoculato il blastomicete, l'autore non esita ad affermare di essere riuscito a determinare neoproduzioni cellulari simili a quelle dell'uomo.

Il blastomicete patogeno studiato da Maffucci e Sirleo [1] fu rinvenuto all'autopsia di una cavia morta di marasma, e pei suoi caratteri morfologici e biologici e per la sua azione patogena somiglia a quelli dianzi descritti. Senonchè gli autori danno una diversa interpretazione delle parti costitutive del parassita: essi credono che questo sia fornito di un nucleo, che la zona ialina debba essere considerata come il protoplasma, il doppio contorno come la membrana del nucleo. Il nucleo avrebbe una parte importante nella moltiplicazione del parassita, e, siccome contiene nel suo interno una sostanza cromatica nerastra, gli autori hanno dato al parassita il nome di *Saccaromyces niger*.

Dai risultati delle inoculazioni in diversi animali (cavie, conigli, polli, cani) gli autori poterono concludere che il detto blastomicete determina fatti di neoproduzione d'indole cronica, i cui prodotti cellulari sono capaci di emigrare da un punto della neoformazione alle glandole linfatiche; che il parassita vive fuori o dentro gli elementi cellulari, e che esso può distruggere le cellule che lo includono, come può da queste essere alla sua volta distrutto.

Dalle ricerche sopra riportate con ordine cronologico di Busse, Sanfelice, Maffucci e Sirleo, si viene ad accertare che alcuni blastomiceti possono esser considerati quali parassiti dell'organismo animale,

[1] Maffucci e Sirleo, *Osservazioni ed esperimenti intorno ad un blastomicete patogeno con inclusione dello stesso nelle cellule dei tessuti patologici.* Il Policlinico, 1° marzo 1895. — Ibid., 1° giugno 1895.

nel quale determinano processi infiammatorî e di neoformazione; tuttavia siamo ben lontani dal poter concludere che le neoformazioni che si riscontrano nell'uomo siano dovute appunto ai blastomiceti isolati da questi autori. Ed invero il Busse ricavò le sue inclusioni cellulari parassitarie dall'uomo, ma la forma patologica trovata in questo e riprodotta negli animali appare così dubbia ed oscura che non si può ricavarne una conclusione precisa. D'altra parte il Sanfelice isolò dall'aria il suo blastomicete; quello di Maffucci e Sirleo fu trovato in una cavia morta per marasma. Ciò importa che i microrganismiî, i quali producono delle neoformazioni negli animali, potrebbero non essere quegli stessi agenti che le producono nell'uomo; dubbio, del resto, che gli stessi Maffucci e Sirleo non hanno potuto dissimularsi, concludendo nella loro seconda nota: « Allora ciò noi affermeremo quando con culture ricavate dai tumori avremo risultato simile negli animali di esperimento ». Nè, d'altronde, le osservazioni recenti, puramente istologiche, fatte in questo indirizzo sui tumori umani da Roncali, [1] Pianese, [2] Ajevoli, [3] ecc., possono invocarsi pro o contro tale idea, sia perchè hanno approdato a risultati contradditorî, e sia perchè mancano della base biologica.

Le nostre ricerche sono dirette appunto a superare questa capitale difficoltà, avendo noi potuto con completa sicurezza ottenere in un caso di tumore maligno dell'uomo, così durante la vita dell'ammalato come all'autopsia, un blastomicete in cultura pura, che negli animali da esperimento ha riprodotto forme neoplastiche analoghe a quelle osservate nell'uomo.

Il caso è il seguente:

Nel dicembre 1894 veniva accolto nella Clinica medica di questa Università, Francesco Baglica, per notevole dimagramento e per tumore dell'addome, i cui sintomi l'infermo facea risalire a circa tre mesi addietro. Dopo alcuni giorni di degenza in Clinica si ebbero versamenti dapprima nell'addome e poi nelle cavità pleuriche.

Con siringa esploratrice sia dall'addome che dalle cavità pleuriche venne estratto un liquido di aspetto lattiginoso. Dal prof. Cervello fu fatta diagnosi di sarcoma delle glandole mesenteriche con versamenti chiliformi.

[1] Roncali, *Sopra particolari parassiti rinvenuti in un adeno-carcinoma (papilloma infettante) della ghiandola ovarica.* Il Policlinico, 1895, pag. 182.

[2] Pianese, *Sulla natura dei corpi cancerosi.* Giornale internaz. delle Scienze mediche, 1895, fasc. 11.

[3] Ajevoli, *Sulla presenza di blastomiceti nei neoplasmi.* Il Policlinico, 1895, pag. 429.

L'infermo morì nell'aprile scorso. All'autopsia si riscontrò, oltre a notevole dimagramento, nelle cavità pleuriche e addominali una grande quantità di liquido cogli stessi caratteri fisici di quelli riscontrati in vita; e inoltre nell'addome una massa neoplastica costituita da neoformazione delle ghiandole linfatiche del mesenterio, del volume di una testa di feto a termine, di forma rotondeggiante, con superficie esterna scarsamente bernoccoluta. La superficie di taglio era di consistenza carnosa, di colorito bianco sporco; da essa diffluiva un liquido simile a quello raccolto nelle cavità. La massa neoplastica aderiva alla colonna vertebrale e si diffondeva anche all'omento ed al tenue, dove si osservavano molti tumoretti della grandezza di una lenticchia. Si trovarono anche parecchi noduli linfatici lungo il decorso del dotto toracico, che si presentava ectasico.

Il liquido estratto durante la vita, sia dall'addome che dalle pleure, si presentava di colorito bianco giallastro, di reazione alcalina, perfettamente inodoro; lasciato riposare per parecchi giorni non coagulava, ma solo si formava alla superficie una pellicola esilissima di colore bianco sporco. L'esame microscopico fatto a goccia pendente permetteva di vedere solamente delle forme cellulari di varia grandezza, delle quali alcune piccole e sferiche si presentavano o isolate o aggruppate a quattro; altre di grandezza media si presentavano isolate con protoplasma omogeneo e circondate da una membrana a doppio contorno, l'esterno ialino, l'interno nero. Alcune di esse presentavano una porzione del loro protoplasma estroflesso in modo da formare una cellula più piccola, più o meno attaccata alla cellula madre e circondata da una espansione della stessa membrana. Si notavano poi delle forme grandissime, quanto una cellula epatica, circondate pure da un doppio contorno e con uno o parecchi granuli nel loro interno. A qualcuna di queste forme grandi si vedevano attaccate delle grosse gemme quasi in completa scissione. Nei preparati colorati con soluzione idroalcoolica di bleu di metilene, il protoplasma di queste forme cellulari appariva leggermente in bleu e la membrana in bleu intenso. Col liquido di Loeffler invece si colorava intensamente tanto la capsula che il protoplasma cellulare.

Coll'ematossilina di Bizzozero, mentre le forme piccole erano tutte colorate in violetto, le forme di media e massima grandezza presentavano colorata in violetto soltanto la zona periferica. Con un miscuglio a parti eguali di verde di malachite e di saffranina all'1 $^0/_0$ le forme grandi presentavano colorata in verde soltanto la zona periferica, tutto il resto incolore; le medie apparivano quasi comple-

tamente in verde, e in esse i corpuscoli intracellulari si mostravano in verde intenso; le forme piccole e isolate e quelle in via di gemmazione avevàno la periferia leggermente colorata in verde, il protoplasma incolore, mentre i corpuscoli intracellulari avevano un colorito verde intenso; ed infine le forme piccole ed aggregate mostravano il corpicciuolo intracellulare in verde intenso, il protoplasma incolore e la glia periferica in rosso bruno. La fuxina carbolica nelle forme grandi colorava la membrana in nero, il protoplasma uniformemente in rosso, i corpuscoli intracellulari in rosso intenso circondati da una sottilissima membrana anch'essa nera; nelle forme medie il protoplasma leggermente in rosso, la membrana cellulare in nero e i corpicciuoli intracellulari in rosso intenso; nelle piccole invece la membrana in nero e il protoplasma cellulare in rosso intenso.

I preparati colorati con tutti i metodi adoperati comunemente per i batterî non mostravano mai alcuna forma di microrganismo tranne che queste cellule sopradescritte.

Dopo la morte dell'individuo le medesime forme cellulari si trovarono in numero straordinario nel liquido contenuto nelle cavità peritoneale e pleuriche, come pure in quello di cui era imbevuto il tumore e che, come abbiamo detto, fuoriusciva facilmente al taglio del medesimo.

Dal liquido estratto durante la vita, da quello avutosi dopo la morte, come pure dal succo del tumore, con le debite cautele asettiche, si fecero degli innesti nei comuni terreni di cultura ed in fucus, che si tennero sia a temperatura dell'ambiente (15°-18° C), sia in stufa a 25° e a 37°.

Gl'innesti rimasero sterili in tutti i terreni, eccetto che nel fucus, dove lo sviluppo si rese apprezzabile dopo 4-5 giorni a temperatura ambiente, dopo 3-4 giorni a 37°. Lo sviluppo più rapido però si ebbe alla temperatura di 25°, alla quale dopo 48 ore si notarono delle colonie, la cui grandezza non oltrepassava quella di una testa di spillo.

Nè dal liquido preso in vita, nè dal materiale utilizzato dopo la morte dell'individuo si ebbero mai, nelle lastre di isolamento, colonie di diversa natura.

Dalle culture pure così ottenute in fucus abbiamo fatto innesti in brodo, in gelatina, in agar semplice, in agar glicerinato, in agar zuccherato, in siero di sangue, in siero di latte, in urina sterilizzata, in liquido d'idrocele, in fucus acido, neutro e leggermente alcalino, su patate, e, oltre a ciò, sopra frutta cotte (pere, mele, prugne) e nelle decozioni delle medesime.

Mentre gl'innesti fatti ripetute volte direttamente dal materiale patologico non dettero risultato positivo che solo sul fucus, sopratutto se neutro o alcalino, nei trapiantamenti successivi da questo negli altri terreni si ebbe per alcuni anche risultato positivo, e cioè in brodo, in gelatina, in agar glicerinato, in agar zuccherato. In tutti gli altri terreni, comprese le patate e le frutta, il risultato fu sempre negativo.

Nel brodo, dopo 48 ore, si ha la formazione di una polvere sottile, che si deposita al fondo della provetta, e si mantiene in scarsa quantità, mentre tutta la massa del brodo rimane perfettamente limpida.

L'aspetto delle colonie in fucus, in gelatina, in agar glicerinato, in agar zuccherato è identico. Le colonie appena nate osservate a debole ingrandimento si mostrano costituite da un insieme uniforme di granuli splendenti. La loro forma è per lo più circolare, qualche volta ovoidale, triangolare o foggiata a guisa di cuore. Nelle colonie più adulte notasi nel centro o anche in un punto eccentrico una massa granulare più oscura, e intorno a questa un'altra massa granulare chiara; in altre colonie, specialmente nelle superficiali, tutta la massa apparisce uniformemente chiara.

Facendo un preparato da una di queste colonie o dalla cultura in brodo, nei primi stadi dello sviluppo, si osservano a forte ingrandimento cellule rotondeggianti simili per la loro grandezza e rifrangenza a quelle più piccole riscontrate nel materiale patologico. Queste cellule piccole non mostrano una doppia membrana, ma un esile contorno, e si presentano raramente isolate, per lo più riunite a gruppi di quattro in modo da sembrare dei grossi tetracocchi. Una sostanza ialina coinvolge ciascun gruppo a guisa di una capsula. Nell'interno delle cellule più adulte non di rado si osserva come un addensamento del protoplasma sotto l'aspetto di un punto più rifrangente, che in un periodo più avanzato appare quasi nero. Alcune di queste cellule si presentano in via di gemmazione. La forma e le fasi evolutive di questo microrganismo si possono studiare bene nelle gocce pendenti in brodo.

Seguendo lo sviluppo in uno di questi preparati, tenuto a temperatura dell'ambiente, per 5-6 giorni di seguito, si nota quanto appresso: In un primo periodo si assiste alla gemmazione delle cellule sopradescritte ed alla consecutiva formazione di svariati aggruppamenti circondati sempre da una glia ialina. In seguito vedesi comparire negli elementi più adulti uno o parecchi granuli neri; poscia in molti di questi aggruppamenti non si distingue più nè il

corpo cellulare nè la glia intercellulare, ma si vede una massa omogenea opalescente, in cui nuotano una quantità di granuli nerastri. Insieme con queste masse si osservano pure delle cellule isolate molto più grandi, di cui alcune con protoplasma uniformemente poco rifrangente, altre lasciano vedere nel loro interno, specialmente verso la periferia, qualche granulo molto più rifrangente: altre poi contengono dei corpicciuoli sferici, dei quali alcuni in via di gemmazione.

Infine, altre di queste forme grandi sono in via di gemmazione quasi completa. Solo raramente si osservano delle forme cellulari fuse fra di loro e con prolungamenti digitiformi, che accennano ad una moltiplicazione per ifi, contenenti verso la periferia dei corpicciuoli sferici di varia grandezza e di colorito nerastro.

Tutte queste fasi evolutive, tenendo la goccia pendente alla temperatura di 37°, si hanno in un tempo molto più breve, generalmente bastano 48 ore.

I preparati fatti da culture invecchiate e trattati col bleu di metilene mostrano il protoplasma cellulare colorato leggermente in bleu, i corpicciuoli intracellulari in bleu molto più intenso. Colla soluzione di verde di malachite e saffranina si ottiene la glia di colore rosso mattone, il protoplasma incolore e i corpicciuoli intracellulari in numero di 3-4 nettamente colorati in verde. Colorando invece con una soluzione di verde di malachite e saffranina, resa al momento alcalino mediante alcune gocce di una soluzione di carbonato sodico, si ottiene la colorazione verde di tutto il corpo cellulare. Coll'eosina si ha la colorazione in rosso dei soli corpicciuoli intracellulari, la massa protoplasmatica e la glia restano completamente scolorate.

I preparati da culture recenti (24-48 ore) trattati con verde di malachite e saffranina mostrano il corpo cellulare colorato uniformemente in rosso vivo, non si osserva la glia esterna, ma solo quella intercellulare, che resta completamente scolorata.

L'ematossilina di Bizzozero colora uniformemente in violetto il corpo cellulare tanto delle forme giovani che delle invecchiate.

I caratteri morfologici ed evolutivi di questo parassita sono evidentemente quelli dei blastomiceti. Infatti, le cellule del microrganismo sono provviste di una membrana che racchiude nel suo interno una massa protoplasmatica generalmente uniforme, ma che in casi speciali assume l'aspetto granulare. Questi granuli, addensandosi sempre più, prendono l'aspetto di corpicciuoli rotondeggianti, che in un periodo ulteriore spiccano maggiormente per il loro contorno di diversa rifrangenza e per la diversa affinità per i colori, e

che infine, rotta la membrana avvolgente, diventano liberi e rappresentano il primo stadio dello sviluppo. Questo ciclo evolutivo si osserva bene nelle culture a goccia pendente.

Un altro metodo di sviluppo è quello per gemmazione, che si osserva in tutte le culture, sopratutto in principio; in tal caso le nuove cellule assumono talvolta, in condizioni non ancora ben definite, l'aspetto di veri prolungamenti della cellula madre, mostrando così la tendenza alla formazione di filàmenti micelici.

Il risultato costantemente negativo delle culture sulle frutta, e la poca tendenza del parassita a svilupparsi in terreni leggermente acidi, inducono a pensare che esso, abituato a vivere nei tessuti dell'organismo, abbia naturalmente subìto delle modificazioni nelle sue attitudini vitali, e come avrebbe acquistato proprietà nuove più adatte all'esistenza parassitaria, così ne avrebbe perduto delle altre che appartengono ai blastomiceti saprofiti. È da notare ancora, che nei terreni nutritivi contenenti zucchero, anche dopo un lungo periodo di sviluppo del parassita, facendo la reazione dell'iodoformio, non si sono scoperte che piccolissime quantità di alcool, e non sempre.

Passiamo a descrivere le forme del microrganismo nell'interno dei tessuti, nonchè il risultato delle inoculazioni negli animali.

Nei tagli microscopici del tumore umano si osservano i seguenti fatti. In mezzo ad uno stroma di tessuto connettivale stanno disposte zolle e cumuli di piccole cellule con nucleo globoso e scarsissimo protoplasma. Questi elementi cellulari assumono intensamente le sostanze coloranti, però si notano qua e là, in mezzo a queste zone di tessuto fortemente colorate, delle altre di aspetto trasparente, dove si può riconoscere la primitiva struttura cellulare, e gli elementi rispettivi in varia fase degenerativa hanno perduta la proprietà di colorarsi.

Tanto nelle zone di tessuto neoformato giovane, quanto in quelle altre, dove è più o meno avanzata la degenerazione, si trovano ammassi granulari di un colorito bruno-nerastro, i quali a debole ingrandimento rassomigliano a zolle pigmentarie. Con ingrandimento più forte i suddetti ammassi risultano costituiti da elementi variamente configurati. Si nota una grandissima quantità di corpuscoli neri perfettamente rotondi e di varia grandezza, in alcuni dei quali, specialmente tra i più grossi, esiste un punto centrale chiaro; di essi la massima parte è sparsa irregolarmente in mezzo al tessuto, un' altra parte presentasi più o meno riunita in zolle. Parecchi

di questi corpicciuoli mostrano chiari processi di sviluppo con formazione di gemme, ma di diverso aspetto: in alcuni si osserva la produzione di cellule rotondeggianti, anch'esse nere, in numero di una e talvolta di due, che risultano da estroflessione del protoplasma materno; in altre la nuova cellula fuoriesce sotto l'apparenza di un prolungamento conico diritto o leggermente incurvato, con apice libero e base impiantata sul corpicciuolo originario, a protoplasma chiaro e a contorno spiccatamente colorato in nero. Non di rado si osservano di questi filamenti conici separati dalla cellula madre e sparsi qua e là. Ma il più delle volte le cellule provviste di tali prolungamenti si presentano in gruppi e sono disposte in guisa da costituire dei veri nidi miceliformi.

Oltre queste cellule nere e le loro gemme rotonde o coniche, si osservano poi in minor numero altre cellule, di forma irregolare e di un colorito giallastro, che dal giallo pallido arriva fino al giallo ranciato. Anche queste cellule si presentano libere o in gruppi, e mostrano poi spesso dei rapporti coi corpicciuoli neri e i prolungamenti micelici anzidetti, rapporti che non è facile definire e interpretare esattamente; alcune volte vedesi una cellula gialla con uno o più corpicciuoli neri nell'interno o alla periferia; altre volte, in mezzo ai nidi miceliformi, formati dall'intreccio dei prolungamenti sopradescritti, notasi un accumulo di cellule giallastre.

Fondandosi sull'esame macroscopico, sull'evoluzione del tumore e sui risultati dell'esame istologico, la neoplasia potrebbe classificarsi nel gruppo dei sarcomi parvicellulari.

Ma quello che maggiormente attira la nostra attenzione è la presenza di quei corpi colorati sopra descritti, variamente disseminati e accumulati in mezzo al tessuto di neoformazione, corpi che ci ricordano le forme cellulari osservate nel liquido ascitico e ottenute nei terreni di cultura. Per noi i corpuscoli neri descritti nei tessuti rappresentano con moltissima probabilità le spore del blastomicete e sono l'equivalente dei granuli neri descritti nelle cellule blastomicetiche delle culture; queste spore, sviluppandosi per successiva formazione di gemme, danno luogo ad altre cellule rotonde o a prolungamenti miceliformi; gli elementi colorati in giallo sono cellule blastomicetiche in vario stadio evolutivo. La colorazione nera e gialla di questi elementi è evidentemente dovuta alla produzione di una sostanza cromatica del loro protoplasma, e che si forma nell'organismo animale, poichè essa riscontrasi anche nei preparati non colorati.

Abbiamo inoculato negli animali così il liquido ascitico (ricavato

asetticamente durante la vita) come il prodotto delle culture pure, servendoci di diverse vie d'introduzione.

Riferiamo i risultati ottenuti dalle inoculazioni fatte sinora su cavie, conigli e cani.

Cavie. — Le cavie furono inoculate nel tessuto sottocutaneo, nella cavità peritoneale e in quella pleurica. La quantità inoculata fu di 5 cmc. di liquido ascitico o di 2 cmc. di cultura in brodo di 10 giorni.

In tutti gli animali si notò un rapido e notevole dimagramento. La morte si ebbe in media dopo 25-30 giorni; alcune però furono uccise in un periodo di tempo più breve.

Tutte le cavie, comunque inoculate, all'autopsia presentarono le ghiandole linfatiche del mesenterio ingrossate fino a raggiungere, in alcune, la grossezza di una nocciuola. Oltre a ciò la rete del mesenterio era cosparsa di un numero infinito di noduletti sferici, di aspetto bianco giallastro, di consistenza quasi cartilaginea e della grossezza da un grano di miglio a quella di un migliarino. Simili noduletti si riscontrarono abbondantissimi nelle regioni inguinali e ascellari, tanto superficiali che profonde, nelle rispettive reti dei linfatici. In alcune cavie si notarono anche dei noduli del medesimo aspetto nella capsula del rene, nei bordi del fegato e sulla superficie della milza, nelle ovaie e nell'epididimo.

Gli innesti fatti in fucus col materiale dei tumori mesenterici, dei noduli linfatici ingorgati, dei noduli riscontrati negli organi parenchimali, nonchè col sangue del cuore, dettero luogo allo sviluppo di colonie pure di blastomiceti identiche, a quelle descritte innanzi.

All'esame microscopico dei tumori si nota uno stroma lasco di tessuto connettivale, dove stanno disposte zolle e cumuli di piccole cellule con nucleo globoso e con scarsissimo protoplasma, del tutto simili a quelle rilevate nell'esame istologico del tumore dell'uomo. In mezzo al tessuto neoformato si osservano pure degli ammassi granulari di colorito bruno-nerastro costituiti degli stessi elementi che abbiamo osservati nel tessuto del tumore umano; senonchè nei tumori di questi animali sono più rare le forme miceliche del parassita ed abbondano invece le forme in via di gemmazione e le cellule brune o giallastre. In alcuni punti del tessuto la quantità di queste forme è tale da eguagliare quasi quella degli elementi istologici.

Conigli. — Furono inoculati con 5 cmc. di liquido ascitico o 5 cmc. di cultura in brodo. Morirono anch'essi in stato di cachessia avanzata nello spazio di 30-35 giorni. Le lesioni macroscopiche e microscopiche erano del tutto simili a quelle osservate nelle cavie.

Inoltre si notò costantemente ulcerazione profonda della mucosa dello stomaco, e in due casi si riscontrarono dei noduli giallicci alla superficie esterna del piloro, che non sono stati ancora da noi studiati.

Cani. — Furono inoculati per la via venosa e per la via peritoneale. I primi morirono tra 2-5 giorni senza presentare alcuna alterazione visibile, solo dal sangue del cuore si poterono ottenere delle culture pure del parassita inoculato. Di quelli inoculati per la via peritoneale, uno presentò un tumore delle glandole mesenteriche della forma e grossezza di un piccolo uovo di gallina, inoltre dei noduli linfatici, della grossezza di un fagiuolo, lungo la colonna vertebrale e nei linfatici peribronchiali. Un altro cane, morto dopo 67 giorni, presentava un nodulo del mesenterio della forma e grossezza di una piccola noce, altri noduli quanto un fagiuolo nell'omento; le anse intestinali erano ricoperte di un liquido denso di aspetto lattiginoso. Il lobo medio ed inferiore del polmone destro si presentavano di colorito giallo-terreo, di consistenza quasi carnosa; tagliati a pezzi e messi nell'acqua non galleggiavano. All'esame istologico dei noduli si notava la solita struttura neoplastica parvicellulare, con zone di tessuto più o meno necrotico e sempre disseminate da punti neri e zolle brunastre simulanti il pigmento. Anche nei preparati del polmone si riscontrava un'infiltrazione parvicellulare, che in alcuni punti riempiva completamente gli alveoli, con presenza degli stessi elementi parassitarî. Mancano però nel cane le forme miceliche del parassita, abbondano invece le altre forme sopradescritte, e specialmente le forme colorate in giallo.

Dagli esperimenti d'inoculazione risulta che il blastomicete da noi studiato è capace di produrre negli animali delle formazioni neoplastiche con localizzazione prevalentemente nelle ghiandole linfatiche, a focolai metastatici multipli, col carattere maligno di una rapida e letale cachessia.

L'analogia completa di sede, di struttura anatomica e del decorso di queste lesioni con quelle osservate nell'uomo, da cui ricavammo il parassita in cultura pura, dimostra che questo sia veramente lo agente patogeno specifico nell'un caso e nell'altro.

Resta così accertato, almeno in questo caso speciale, il nesso etiologico fra il tumore maligno ed il blastomicete da noi studiato.

Questo blastomicete patogeno differisce, come si è visto, pei suoi caratteri morfologici e sopratutto per le sue modalità di sviluppo nei terreni nutritivi da quelli studiati da Busse, Sanfelice, Maffucci e Sirleo. Noi non crediamo di conoscere ancora tutte le fasi del ciclo

evolutivo, tuttavia possiamo riassumere i caratteri principali da noi rilevati nel modo seguente:

Il parassita nelle culture artificiali si sviluppa per gemmazione delle cellule madri o per endospore, le quali, divenute libere, possono o per ingrandimento del proprio corpo cellulare o per gemmazione riprodurre le cellule rotondeggianti originali: la produzione di forme miceliche abortive nei terreni nutritivi è rara.

Nell'organismo animale, invece, si hanno le seguenti forme: corpi di varia grandezza colorati fortemente in nero, che noi consideriamo come spore; non di rado, sopratutto nell'uomo e nelle cavie, si nota l'accenno ad una formazione di ifi e di micelî dalle spore anzidette; infine si riscontrano cellule, più o meno grandi, in via di gemmazione o di sporificazione, oppure in fase degenerativa e colorate più o meno intensamente in giallo.

I casi di ascite chilosa sono un reperto molto raro. In Italia se ne sono osservati solamente tre: ascite chilosa per tumore del pancreas, studiato dal Belfanti [1] nel 1887 nella Clinica medica di Torino; ascite chilosa con carcinoma gastrico, pubblicato dal Maragliano [2] nel 1892; ascite chilosa con sarcoma del mesenterio e con diffusione alle ghiandole prevertebrali, osservato dal Verdelli [3] nella Clinica medica di Parma.

Per brevità tralasciamo di far menzione degli altri pochi casi di ascite chilosa pubblicati all'estero, i quali del resto sono riportati in ordine cronologico nel lavoro del Verdelli.

La speciale natura del liquido e il possibile significato del versamento ha richiamato l'attenzione di tutti coloro che hanno avuto l' occasione di osservare questi casi di ascite, e alcuni studiarono molto diligentemente i diversi componenti chimici che lo costituiscono.

Il Quincke, [4] il Winckel, [5] il Verdelli [6] si sono anche soffermati sull'esame microscopico, ed hanno costantemente riscontrato la

[1] Belfanti, *Ricerche chimiche sopra il liquido estratto da un'ascite chilosa.* Riforma medica, 1887, pag. 592.

[2] Maragliano, *Ascite chilosa in un individuo affetto da carcinoma gastrico.* Lezione di chiusura nell'anno scolastico 1891-92.

[3] Verdelli, *Sulle asciti chiliformi.* Il Morgagni, 1894.

[4] Quincke, *Ueber fetthaltiger Transudate.* Deutsches Arch. f. Klin. med., vol. XVI, pag. 121.

[5] Winckel, *Chylöser Ascites, bewirkt durch Parasiten.* Deutsches Arch. f. Klin. med., vol. XVII, pag. 303.

[6] Verdelli, loc. cit.

presenza di *frequenti gruppi di cellule piuttosto voluminose, rigonfie, idropiche, rotondeggianti, a protoplasma talora omogeneo, quasi ialino, talora contenente granuli e goccioline splendenti di grasso; in esse non sempre era visibile il nucleo, e, quando lo era, appariva molto voluminoso; non assomigliavano per nulla alle comuni cellule endoteliali e dovevansi ritenere di origine neoplastica.*

Ma uno studio microscopico e batteriologico completo non era stato ancora fatto. Ed ora, in base alle nostre ricerche, è lecito concludere con grandissima probabilità che le cellule delle quali fu questione in molti casi di ascite chilosa, interpretate variamente, dai più credute elementi neoplastici, non sieno altro che forme evolutive del blastomicete da noi studiato.

E così, con la scoperta di questo parassita, che è dotato della proprietà di produrre neoplasie maligne, resta aperto anche un nuovo indirizzo allo studio delle asciti chiliformi e dei rapporti che legano frequentemente tali versamenti alla presenza di tumori maligni nell'uomo.

Spiegazione delle tavole.

Tavola XII.

Fig. 1. Colonie del blastomicete in vario grado di sviluppo (ingr. 100 ×).

Fig. 2. Cultura giovane del blastomicete dopo 48 ore, colorata col liquido di Loëffler (ingr. 1000 ×).

Fig. 3. Cultura vecchia dopo un mese circa, preparato colorato col liquido di Loëffler (ingr. 1000 ×).

Fig. 4-12. Fasi di sviluppo del blastomicete a goccia pendente durante 5 giorni di osservazione. — Oc. 4 - Ob. $^1/_{15}$ semiap. - Koristka.

Fig. 13. Preparato a fresco del liquido ascitico. — Oc. 4 - Ob. $^1/_{15}$ semiap. Koristka.

Tavola XIII.

Fig. 1. Forme del blastomicete del liquido ascitico colorato con bleu di metilene. — Oc. 4 - Ob. $^1/_{15}$ semiap. - Koristka.

Fig. 2. Idem col liquido di Loëffler.

Fig. 3. Idem con fuxina carbolica.

Fig. 4. Idem con verde di malachite e saffranina.

Fig. 5. Idem con ematossilina di Bizzozero.

Fig. 6. Preparato a stampo di cultura di 28 ore colorato con verde di malachite e saffranina.

Fig. 7. Preparato da cultura vecchia (1 mese) colorato con verde di malachite e saffranina.

Fig. 8. Colonia adulta colorata con bleu di metilene.
Fig. 9. Varie forme del parassita nei tumori del cane. — Oc. 4 compens. - Ob. 2 mm. 1.30 - Zeiss.
Fig. 10. Idem nei tumori della cavia.

TAVOLA XIV.

Fig. 1. Tumore dell'uomo (colorazione con eosina). Si vedono i parassiti isolati o riuniti in massa e colorati in giallo e in nero da simulare zolle pigmentate. — Oc. 3 - Ob. A - Zeiss.
Fig. 2. Idem. — Oc. 3 - Ob. DD - Zeiss.
Fig. 3. Idem. — Oc. 3 - Ob. DD - Zeiss.
Fig. 4. Tumore di una cavia inoculata con liquido ascitico (colorazione con eosina). — Oc. 3 - Ob. A - Zeiss.
Fig. 5. Idem. — Oc. 3 - Ob. DD - Zeiss.

TAVOLA XV.

Fig. 1. Tumore di una cavia inoculata colla cultura (taglio non colorato). — Oc. 3 - Ob. DD - Zeiss.
Fig. 2. Tumore di un cane inoculato colla cultùra (colorazione con eosina). — Oc. 3 - Ob. DD - Zeiss.
Fig. 3. Tumore del polmone di un cane. — Oc. 3 - Ob. DD - Zeiss.
Fig. 4. Idem. — Oc. 3 - Ob. DD - Zeiss.
Fig. 5. Varie forme del parassita nei tumori dell'uomo. — Oc. 4 compens. - Ob. 2 mm. 1.30 - Zeiss.

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

13

12

Lo Verde dis.

Stab. Lit. A. Brangi Palermo

rde dis.

Stab. Lit. A. Brangi Palermo

Lo Verde dis.

Stab. Lit. A. Brangi Palermo.

Verde dis.

Stab. Lit. A. Brangi Palermo